



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)**
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

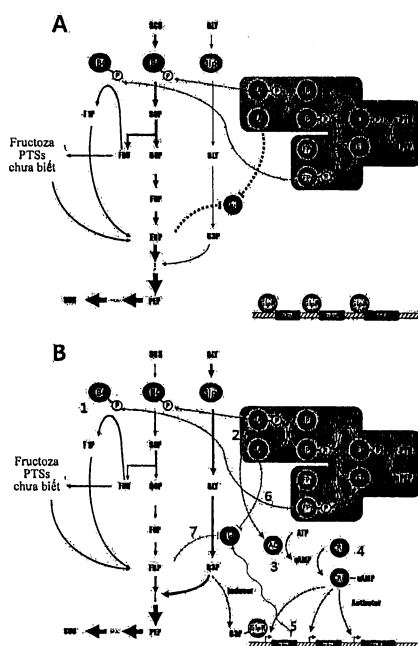
(11) 
1-0021980

(51)⁷ **C12N 1/21, 15/52, C12P 7/40, C12N 1/20, (13) B**
C12P 7/46, C12R 1/01

(21) 1-2013-00959 (22) 30.08.2011
(86) PCT/KR2011/006382 30.08.2011 (87) WO2012/030130A2 08.03.2012
(30) 10-2010-0084327 30.08.2010 KR
(45) 25.10.2019 379 (43) 25.06.2013 303
(73) KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (KR)
373-1, Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Republic of Korea
(72) LEE, Sang Yup (KR), LEE, Jeong Wook (KR), CHOI, Sol (KR), YI, Jongho (KR)
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) **VI SINH VẬT ĐỘT BIẾN SẢN SINH AXIT SUXINIC SỬ DỤNG ĐỒNG THỜI SUCROZA VÀ GLYXERIN, PHƯƠNG PHÁP TẠO RA VI SINH VẬT ĐỘT BIẾN NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP SẢN XUẤT AXIT SUXINIC BẰNG CÁCH SỬ DỤNG VI SINH VẬT NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic mà có khả năng sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin để sản xuất axit suxinic, sinh vật đột biến này thu được bằng cách làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza ở vi sinh vật sản sinh axit suxinic, Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất axit suxinic bằng cách sử dụng vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic, có khả năng sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin làm nguồn cacbon. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic, có khả năng sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin để sản xuất axit suxinic, sinh vật đột biến này thu được bằng cách làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza ở vi sinh vật sản sinh axit suxinic. Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất axit suxinic bằng cách sử dụng vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Axit suxinic là axit đicacboxylic có 4 nguyên tử cacbon và có thể được sử dụng trong các ứng dụng công nghiệp khác nhau. Axit suxinic có thể được sử dụng làm tiền chất của các hóa chất công nghiệp quan trọng, bao gồm axit adipic, 1,4-butanediol, etylendiamin đisuxinat, axit itaconic, γ -butyrolacton, axit γ -aminobutyric, và tetrahydrofuran, và trên quy mô toàn cầu, thị trường về axit suxinic bao gồm các tiền chất của chúng được đánh giá là khoảng 15 tỷ đô la (McKinlay *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 76:727, 2007). Với mối quan tâm hiện nay về sự phát triển môi trường bền vững và do sự giảm trữ lượng dầu mỏ dẫn đến sự dao động về giá thành, các nghiên cứu trên quy mô toàn cầu về việc sản xuất axit suxinic dựa trên các quy trình sinh học đã được tiến hành từ nhiều thập kỷ qua (McKinlay *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 76:727, 2007; Song *et al.*, Enzyme Microbial Technol., 39:352, 2006; Jantama *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 99:1140, 2008). Tuy nhiên, cho đến nay chưa có bất kỳ chủng vi sinh vật nào được phát triển mà có khả năng tăng tối đa năng suất và hiệu suất axit suxinic đồng thời giảm đến mức thấp nhất sự hình thành sản phẩm phụ. Nếu năng suất cao thì hiệu quả thấp, và ngược lại, nếu hiệu quả cao thì năng suất lại thấp. Ngoài ra, nếu năng suất cao, lượng sản phẩm phụ tạo ra cũng lớn. Do đó, chủng vi sinh vật lý tưởng mà có thể làm tăng năng suất và hiệu suất đồng thời chỉ sản sinh ra axit suxinic vẫn chưa được phát triển (Jantama *et al.*, Biotechnol. Bioeng., 99:1140, 2008).

Sucroza có giá thành bằng khoảng 1/4 giá thành của glucoza, thường được sử dụng làm nguyên liệu để sản xuất axit suxinic bằng phương pháp lên men nhờ vi khuẩn. Ngoài ra, với sự gia tăng nhanh trong việc sản xuất diezen sinh học trên toàn cầu, glyxerin được tạo ra dưới dạng sản phẩm phụ, và giá thành của chúng giảm do có nguồn cung dồi dào và phương pháp thích hợp để xử lý glyxerin là cần thiết. Do đó, giá thành của glyxerin là rất thấp và tiếp tục giảm (Miller-Klein Associates, Oct. 2006).

Trong khi đó, hầu hết các vi sinh vật ưu tiên sử dụng các nguồn cacbon được ưu tiên từ hỗn hợp gồm nhiều nguồn cacbon khác nhau. Để có thể thực hiện được điều này, hầu hết các vi sinh vật đều có cơ chế ức chế dị hóa để ức chế việc sử dụng các nguồn cacbon không được ưu tiên khi có sẵn các nguồn cacbon được ưu tiên (Gorke *et al.*, Nature Reviews, 6:613, 2008). Liên quan đến việc sử dụng ưu tiên các nguồn cacbon được điều hòa bởi cơ chế ức chế dị hóa, *E. coli* đã được biết là thể hiện sinh trưởng hai kỳ (lưỡng sinh trưởng) với sự có mặt của cả hai nguồn cacbon là glucoza và lactoza, theo báo cáo của Monod và các đồng tác giả năm 1942. Trong đó, nguồn cacbon được ưu tiên là glucoza, và do đó *E. coli* thể hiện đường cong sinh trưởng hai kỳ (lưỡng sinh trưởng), trong đó nguồn cacbon không được ưu tiên lactoza bắt đầu được sử dụng sau pha tiềm phát (pha lag) ngắn sau khi nguồn cacbon được ưu tiên là glucoza đã được tiêu thụ hoàn toàn. Ngoài ra, do cơ chế ức chế dị hóa này, các chủng *Mannheimia* nhìn chung là rất khó để sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin. Tuy nhiên, việc sử dụng glyxerin làm nguồn cacbon mang lại nhiều lợi ích. Glyxerin được khử mạnh và khi được sử dụng làm nguồn cacbon, các đương lượng khử (NADH, NADPH, FADH₂, v.v.) được tạo ra với lượng gấp hai lần so với các đường như glucoza, xyloza và sucroza trong quá trình sản sinh hợp chất trung gian phosphoenolpyruvat (phosphoenolpyruvate - PEP). Do đó, glyxerin là nguồn cacbon hấp dẫn để sản xuất các hóa chất khử (Yazdani *et al.*, Curr. Opin. Biotechnol., 18:213, 2007). Tuy nhiên, trong nhiều trường hợp, tốc độ sinh trưởng của tế bào nhờ việc sử dụng glyxerin ở các điều kiện kỵ khí là chậm hơn so với tốc độ sinh trưởng của tế bào nhờ việc sử dụng các loại đường khác, do đó việc sử dụng glyxerin làm nguồn cacbon duy nhất có lợi thế về năng lượng khử, nhưng có hạn chế trong việc tăng năng suất sản phẩm sinh học mong muốn bởi vì nó thể hiện tốc độ sinh trưởng thấp.

Để khắc phục hạn chế này, nếu tốc độ sử dụng glyxerin có thể tăng trong khi sử dụng các đường như sucroza, các đường này có tốc độ sử dụng cao hơn so với glyxerin và làm cho tế bào có khả năng sinh trưởng ở mức độ và tốc độ cao hơn, các tế bào có thể

sinh trưởng ở tốc độ cao trong khi sử dụng ưu điểm về năng lượng khử cao của glyxerin, và do đó các hợp chất khử, đặc biệt là axit suxinic, có thể được sản xuất một cách hiệu quả.

Do đó, các tác giả sáng chế đã rất nỗ lực để phát triển phương pháp sản xuất axit suxinic có độ tinh khiết cao và hiệu quả cao bằng cách sử dụng đồng thời hai nguồn cacbon giá rẻ là sucroza và glyxerin. Kết quả là, các tác giả sáng chế đã phát hiện ra rằng, khi nuôi cấy vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic, thu được bằng cách làm mất gen mã hóa fructoza phosphotransferaza từ vi sinh vật sản sinh axit suxinic hoặc đưa gen mã hóa glyxerin kinaza vào vi sinh vật, cơ chế ức chế dị hóa trong vi sinh vật đột biến được giảm nhẹ do vậy mà vi sinh vật đột biến có thể sản xuất axit suxinic bằng cách sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin, giảm thiểu sản xuất sản phẩm phụ, và sản xuất axit suxinic đồng nhất với hiệu quả cao và năng suất rất cao, là điều mà các phương pháp thông thường không thể đạt được, do đó hoàn thiện sáng chế.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất vi sinh vật đột biến, trong đó cơ chế ức chế dị hóa được giảm nhẹ, do vậy mà vi sinh vật này có khả năng sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin để tăng tối đa hiệu suất sản xuất axit suxinic đạt gần tới mức lý thuyết đồng thời giảm thiểu việc sản sinh các sản phẩm phụ, do đó sản xuất được axit suxinic đồng nhất.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp sản xuất axit suxinic đồng nhất bằng cách sử dụng vi sinh vật đột biến sử dụng sucroza và glyxerin làm các nguồn cacbon ở điều kiện kỵ khí mà không tạo ra các sản phẩm phụ.

Để đạt được các mục đích trên đây, sáng chế đề xuất vi sinh vật đột biến có khả năng sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin để sản xuất axit suxinic, vi sinh vật đột biến này thu được bằng cách làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza ở vi sinh vật sản sinh axit suxinic.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp tạo ra vi sinh vật đột biến có khả năng sử dụng sucroza và glyxerin để sản xuất axit suxinic, phương pháp này bao gồm việc làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza ở vi sinh vật sản sinh axit suxinic.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất axit suxinic, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic trên đây ở điều kiện kỵ khí; và thu hồi axit suxinic từ dịch nuôi cấy.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 thể hiện bằng sơ đồ các con đường chuyển hóa của sucroza và glyxerin và cơ chế ức chế dị hóa trong chủng *Mannheimia*. Cụ thể, Fig.1A thể hiện các con đường chuyển hóa chung của sucroza và glyxerin và cơ chế ức chế dị hóa giữa chúng, và Fig.1B thể hiện các phần của Fig.1A, mà có thể được thiết kế theo cách chuyển hóa để làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa (GLY, glyxerin; G3P, glyxerin 3-phosphat; SCR, sucroza; G6P, glucoza 6-phosphat; FRU, fructoza; F1P, fructoza 1-phosphat; FBP, fructoza 1,6-bisphosphat; PEP, phosphoenolpyruvat; SUC, axit suxinic; PYR, axit pyruvic; IIBCF, đơn vị fructoza PTS IIBC; IIBCS, đơn vị sucroza PTS IIBC; EI, enzym I; HPr, protein histidin; IIA, PTS enzym IIA; Fpr, protein IIA/HPr đặc hiệu fructoza hai chức năng; AC, adenylat xyclaza; cAMP, AMP vòng; CRP, protein thụ thể cAMP).

Fig.2 là tập hợp các đồ thị thể hiện sự sinh trưởng tế bào và sự sản sinh chất chuyển hóa thu được trong nuôi cấy lên men theo mẻ bổ sung cơ chất của chủng *M. succiniciproducens* PALK (Fig.2A), chủng *M. succiniciproducens* PALFK (Fig.2B) và chủng *M. succiniciproducens* PALKG (Fig.2C).

Fig.3 là đồ thị thể hiện sự sinh trưởng tế bào và sự sản sinh chất chuyển hóa thu được trong nuôi cấy bổ sung cơ chất của chủng *M. succiniciproducens* PALFK được bổ sung với nồng độ tế bào cao.

FIG.4A là sơ đồ thể hiện phương pháp nuôi cấy MCRB, trong đó đường nét liền chỉ đường chảy của dòng chất lỏng (môi trường, môi trường chứa tế bào, môi trường chứa chất chuyển hóa, v.v.), và đường chấm chấm chỉ dòng chảy của khí (cacbon đioxit). Fig.4B là đồ thị thể hiện sự sinh trưởng tế bào và sự sản sinh chất chuyển hóa thu được trong nuôi cấy chủng *M. succiniciproducens* PALFK, được tiến hành bằng phương pháp nuôi cấy MCRB.

Mô tả chi tiết sáng chế

Trừ khi có quy định khác, tất cả các thuật ngữ khoa học và kỹ thuật được sử dụng ở đây có cùng ý nghĩa như thường được hiểu bởi chuyên gia trong lĩnh vực mà sáng chế

liên quan. Nhìn chung, danh pháp được sử dụng ở đây là đã được biết rõ và thường được dùng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến vi sinh vật đột biến có khả năng sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin để sản xuất axit suxinic, vi sinh vật đột biến này thu được bằng cách làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza ở vi sinh vật sản sinh axit suxinic.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “cơ chế ức chế dị hóa” chỉ cơ chế ức chế việc sử dụng nguồn cacbon không được ưu tiên của vi khuẩn khi có mặt nguồn cacbon được ưu tiên khi vi sinh vật được nuôi cấy trong môi trường, mà trong đó có mặt nhiều nguồn cacbon khác nhau (Gorke *et al.*, Nature Reviews, 6:613, 2008).

Đối với chủng *Mannheimia* là chủng sản sinh axit suxinic, sucroza và glyxerin có thể không được sử dụng đồng thời để sản xuất axit suxinic do cơ chế ức chế dị hóa này.

Thông thường, khi sucroza và glyxerin có mặt đồng thời, glyxerin được sử dụng sau khi nguồn cacbon được ưu tiên là sucroza đã được tiêu thụ hết. Ngoài ra, *Mannheimia* ưu tiên sử dụng sucroza hơn glucoza do vậy mà nó chuyển hóa sucroza nhanh hơn khi có mặt đồng thời sucroza và glyxerin.

Mục đích của sáng chế là làm giảm nhẹ nhân tạo cơ chế ức chế dị hóa này.

Cơ chế ức chế dị hóa này có thể được chia ở mức độ lớn thành hai loại: ức chế phiên mã, và ức chế dị lập thể (Deutscher *et al.*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., 70:939, 2006; Gorke *et al.*, Nature reviews, 6:613, 2008; Pettigrew *et al.*, J. Bacteriol., 178:2846, 1996; Zwaig *et al.*, J. Bacteriol., 102:753, 1970). Đối với cơ chế ức chế phiên mã, gen điều hòa *GlpR* ức chế sự phiên mã của các gen tham gia vào quá trình vận chuyển nội bào và sử dụng glyxerin. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “ức chế dị lập thể” chỉ sự giảm hoạt tính glyxerin kinaza do liên kết của fructoza 1,6-bisphosphat (FBP) hoặc EIIA với glyxerin kinaza, enzym này đóng vai trò chủ đạo trong quá trình chuyển hóa glyxerin. Trong môi trường có mặt đồng thời sucroza và glyxerin, cơ chế ức chế phiên mã bởi gen điều hòa *GlpR* và ức chế dị lập thể bởi FBP và EIIA xuất hiện đồng thời do vậy mà quá trình chuyển hóa glyxerin thường bị ức chế. Chiến thuật có khả năng làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa này tránh được ức chế phiên mã do gen *GlpR* và ức chế dị lập thể do FBP và EIIA.

Fig.1 là sơ đồ các con đường chuyển hóa của sucroza và glyxerin và cơ chế ức chế dị hóa trong chủng *Mannheimia*. Cụ thể, Fig.1A thể hiện các con đường chuyển hóa chung của sucroza và glyxerin và cơ chế ức chế dị hóa giữa chúng, và Fig.1B thể hiện các phần của Fig.1A, mà có thể được thiết kế theo cách chuyển hóa để làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa. Trên Fig.1, mũi tên đường nét liền để chỉ các con đường chuyển hóa của sucroza và glyxerin, và độ đậm của mũi tên thể hiện tốc độ chuyển hóa tương đối. Mũi tên đường nét chấm mảnh để chỉ quá trình, trong đó nhóm phosphoryl được chuyển liên tục từ đơn vị PEP sang đơn vị PTS IIBC, và mũi tên đường nét chấm đậm thể hiện bằng sơ đồ các con đường khác nhau có khả năng gây cảm ứng sự biểu hiện của operon *glp*, bao gồm con đường bắt đầu từ IIA được phosphoryl hóa, con đường bắt đầu từ adenylat xyclaza (AC), con đường bắt đầu từ CRP-cAMP, con đường bắt đầu từ G3P-GlpR, v.v.. Đường nét chấm đậm có hình chữ T ở đầu để chỉ mức độ ức chế dị lập thể tương đối do IIA không phospho hóa và/hoặc fructoza 1,6-bisphosphat (FBP) được áp dụng cho glyxerin kinaza (GlpK) mà đóng vai trò chủ đạo trong operon *glp*.

Như được thể hiện trên Fig.1A, cơ chế ức chế dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza được chia ở mức độ lớn thành ức chế phiên mã bởi GlpR hoặc tương tự, và ức chế dị lập thể bởi FBP và EIIA. Như được thể hiện trên Fig.1B, các phương pháp để khắc phục cơ chế ức chế này bao gồm phương pháp khắc phục cơ chế ức chế phiên mã bằng cách gây cảm ứng việc sản sinh các chất hoạt hóa khác nhau, phương pháp làm giảm nhẹ cơ chế ức chế dị lập thể qua trung gian GlpK bằng cách làm giảm nồng độ FBP hoặc IIA, và tương tự.

Ví dụ, phương pháp trong đó IIBCF được loại từ phần 1 của Fig.1B do vậy mà nồng độ IIA được phosphoryl hóa tăng tương đối để cảm ứng sự biểu hiện của AC, và do đó cAMP được sản sinh ra nhiều hơn rất nhiều để làm tăng sự sản sinh CRP-cAMP, do đó gây cảm ứng sự biểu hiện của operon *glp*. G3P được sản sinh bởi GlpK do đó được biểu hiện thêm nữa, làm tách gen ức chế phiên mã GlpR ra khỏi các vị trí liên kết ADN của regulon *glp* (*glpABC*, *glpF*, *glpK*, v.v..) tạo thuận lợi cho quá trình phiên mã của các gen của regulon *glp*. Ở thời điểm này, nồng độ IIA không phospho hóa được duy trì ở mức độ tương đối thấp, và sự chuyển hóa toàn bộ của sucroza giảm do việc loại đi IIBCF, do vậy mà nồng độ FBP cũng giảm tương đối, do đó làm giảm bớt ức chế dị lập thể. Tác động đồng thời của hai yếu tố này dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Một ví dụ khác, phương pháp trong đó nồng độ IIA được phosphoryl hóa trong phần 2 của Fig.1B được tăng lên để gây cảm ứng sự biểu hiện AC, và do đó cAMP được sản sinh nhiều hơn rất nhiều để làm tăng việc sản sinh CRP-cAMP, do đó gây biểu hiện của operon glp. G3P được sản sinh bởi GlpK do đó được biểu hiện thêm nữa, làm tách gen ức chế phiên mã GlpR ra khỏi các vị trí liên kết ADN của regulon glp tạo thuận lợi cho quá trình phiên mã của các gen của regulon glp, dẫn đến sự tăng chuyển hóa glyxerin.

Một ví dụ khác nữa, phương pháp trong đó sự biểu hiện quá mức của AC trong phần 3 của Fig.1B được cảm ứng do vậy mà cAMP được sản sinh nhiều hơn rất nhiều để làm tăng sự sản sinh CRP-cAMP, do đó gây cảm ứng sự biểu hiện của operon glp. G3P được sản sinh bởi GlpK do đó được biểu hiện thêm nữa, làm tách gen ức chế phiên mã GlpR ra khỏi các vị trí liên kết ADN của regulon glp tạo thuận lợi cho quá trình phiên mã của các gen của regulon glp, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Một ví dụ khác nữa, phương pháp trong đó sự biểu hiện quá mức của CRP trong phần 4 của Fig.1B và sự biểu hiện quá mức của AC trong phần 3 của Fig.1B được gây cảm ứng đồng thời do vậy mà việc sản sinh CRP-cAMP tăng lên, do đó cảm ứng sự biểu hiện của operon glp. G3P được sản xuất bởi GlpK do đó được biểu hiện thêm nữa, làm tách gen ức chế phiên mã GlpR ra khỏi các vị trí liên kết ADN của regulon glp tạo thuận lợi cho quá trình phiên mã của các gen của regulon glp, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Một ví dụ khác nữa, phương pháp trong đó sự biểu hiện quá mức của CRP trong phần 4 của Fig.1B được cảm ứng do vậy mà việc sản sinh CRP-cAMP tăng lên, do đó gây cảm ứng sự biểu hiện của operon glp. G3P được sản sinh bởi GlpK do đó được biểu hiện thêm nữa, làm tách gen ức chế phiên mã GlpR ra khỏi các vị trí liên kết ADN của regulon glp tạo thuận lợi cho quá trình phiên mã của các gen của regulon glp, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Một ví dụ khác nữa, phương pháp trong đó sự biểu hiện quá mức của GlpK trong phần 5 của Fig.1B được cảm ứng do vậy mà việc sản sinh G3P tăng lên. Điều này làm tách gen ức chế phiên mã GlpR ra khỏi các vị trí liên kết ADN của regulon glp để tạo thuận lợi cho quá trình phiên mã của các gen của regulon glp, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Một ví dụ khác nữa, phương pháp trong đó tất cả các gen trong regulon glp được biểu hiện quá mức hoặc các dạng kết hợp khác nhau của một số gen trong số các gen được biểu hiện quá mức này, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Phương pháp khác nữa, trong đó gen khởi đầu biểu hiện quá mức không có vị trí mà GlpR có thể liên kết vào đó, được đưa vào vị trí của gen khởi đầu để biểu hiện mỗi đơn vị phiên mã của regulon glp trên nhiễm sắc thể trong phần 5 của Fig.1B, do vậy mà sự ức chế bởi GlpR về cơ bản bị chặn và regulon glp được biểu hiện quá mức, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Ngoài ra, phương pháp trong đó GlpR bị loại bỏ do vậy mà sự ức chế biểu hiện của regulon glp được giảm nhẹ, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin. Một ví dụ khác nữa, phương pháp trong đó nồng độ IIA và/hoặc FBP trong các phần 6 và 7 của Fig.1B giảm do vậy mà mức độ ức chế dị lập thể bởi GlpK giảm, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin.

Ngoài các phương pháp được liệt kê trên đây, còn có các dạng kết hợp có thể của các phương pháp này, và các phương pháp hiện nhiên từ các phương pháp đó, ví dụ, phương pháp trong đó glyxerin kinaza có nguồn gốc từ chủng khác loại được thiết kế để trải qua ít ức chế dị lập thể hơn hoặc trải qua ức chế dị lập thể được biểu hiện quá mức, dẫn đến tăng chuyển hóa glyxerin. Ngoài ra, phương pháp trong đó cơ chế ức chế dị hóa được giảm nhẹ do đó có thể hoạt hóa sự chuyển hóa glyxerin.

Trong khi đó, axit suxinic là ví dụ điển hình của hóa chất khử này và là hợp chất C₄ chứa hai nhóm axit cacboxylic và có PEP (phosphoenolpyruvat) làm tiền chất trung gian. Ngoài ra, các vi sinh vật sản sinh axit suxinic chỉ các vi sinh vật mà sản sinh lượng axit suxinic nhiều hơn so với các chất chuyển hóa khác và có thể được sử dụng thương mại để sản xuất axit suxinic bằng phương pháp lên men. Các vi sinh vật sản sinh axit suxinic điển hình bao gồm vi khuẩn dẹt cò. Vi khuẩn dẹt cò đã được biết đến bao gồm *Actinobacillus* sp., *Anaerobiospirillum* sp., và *Mannheimia* sp. (bao gồm *Basfia* sp. *Basfia* sp. khi được phân lập đầu tiên được gọi là “*Mannheimia*”, và sau đó được gọi là “*Basfia* sp.”, và trình tự 16S rARN có mức độ tương đồng 99,8% với trình tự 16S rARN của *Mannheimia* sp. Do đó, *Basfia* sp. còn được gọi là “*Mannheimia* sp.” trong sáng chế (Scholten *et al.*, WO2009/024294A1; Kuhnert *et al.*, Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 60:44). Từ thông tin di truyền một phần (16s rARN), phân tích enzym, và các kết quả lên men của các vi khuẩn dẹt cò khác nhau đã được biết để sản xuất axit suxinic cho đến nay,

đã phát hiện ra rằng con đường sinh tổng hợp chính để sản xuất axit succinic từ nguồn cacbon trong các vi khuẩn dạ cỏ này gần như giống với con đường sinh tổng hợp để sản xuất axit succinic trong *Mannheimia* sp., là một loại vi khuẩn dạ cỏ. Đặc biệt là tất cả vi khuẩn dạ cỏ tham gia vào việc sản xuất axit succinic chuyển hóa các hợp chất C₃ (phosphoenolpyruvat và pyruvat) thành hợp chất C₄ (oxaloacetat và malat) nhờ sử dụng enzym cố định CO₂ và chuyển hóa các hợp chất C₄ thành fumarat, do đó sản xuất ra axit succinic (Zeikus *et al.*, Appl. Microbiol. Biotechnol., 51:545, 1999; Lee *et al.*, Appl. Environ. Microbiol., 72:1939, 2006). Nói cách khác, tất cả các vi khuẩn dạ cỏ, bao gồm *Mannheimia* sp., có con đường sinh tổng hợp axit succinic giống nhau, và hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực này rằng việc gây đột biến gen theo sáng chế có thể được áp dụng cho các chủng sản xuất axit succinic có nguồn gốc từ vi khuẩn dạ cỏ ngoài *M. succiniciproducens* được thể hiện trong các ví dụ của sáng chế.

Theo sáng chế, vi sinh vật sản sinh axit succinic có thể là vi khuẩn dạ cỏ. Vi khuẩn dạ cỏ này có thể được chọn từ nhóm bao gồm *Mannheimia* sp., *Actinobacillus* sp., và *Anaerobiospirillum* sp..

Theo sáng chế, chủng *Mannheimia* sp. có thể là *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP).

Theo sáng chế, việc làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa có thể được tiến hành bằng cách làm mất gen mã hóa fructoza phosphotransferaza, và vi sinh vật đột biến có thể là *Mannheimia succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP).

Theo sáng chế, việc làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa có thể được tiến hành bằng cách đưa vào gen mã hóa glycerin kinaza, và vi sinh vật đột biến sản sinh axit succinic có thể là *Mannheimia succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP).

Theo sáng chế, vi sinh vật đột biến sản sinh axit succinic có khả năng sản sinh axit succinic với hiệu suất tối đa mà không sản sinh axit hữu cơ khác, được thiết kế bằng cách sử dụng kỹ thuật di truyền đối với vi khuẩn dạ cỏ, là vi sinh vật sản sinh axit succinic.

Trong một ví dụ của sáng chế, chủng *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) có khả năng chuyển hóa đồng thời sucroza và glycerin, được thiết kế bằng cách làm mất gen mã hóa fructoza phosphotransferaza (*fruA*) từ ADN hệ gen của chủng *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP). Chủng được thiết kế sản sinh axit succinic với hiệu suất và năng suất cao mà không sản sinh các sản phẩm phụ.

Theo sáng chế, việc làm mất từng gen được tiến hành bằng cách làm bất hoạt gen quan tâm nhờ sử dụng phương pháp tái tổ hợp tương đồng. Tuy nhiên, có thể sử dụng phương pháp thiết kế gen bất kỳ mà không có giới hạn cụ thể trong sáng chế, chỉ cần là phương pháp đó có thể biến đổi hoặc loại bỏ gen quan tâm do vậy mà enzym được mã hóa bởi gen quan tâm đó không được sản xuất ra.

Theo sáng chế, việc nuôi cấy vi sinh vật đột biến sản sinh axit succinic và việc thu hồi axit succinic có thể được tiến hành nhờ sử dụng các phương pháp bất kỳ đã được biết trong các quá trình lên men thông thường.

Theo sáng chế, hiệu suất axit succinic, việc sản sinh sản phẩm phụ và khả năng chuyển hóa các nguồn cacbon được so sánh giữa *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) và chủng đột biến thông thường (*M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP)). *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) là vi sinh vật đột biến thu được bằng cách làm mất gen mã hóa lactat dehydrogenaza (*ldhA*), gen mã hóa phosphotransaxetylaza (*pta*) và gen mã hóa axetat kinaza (*ackA*) từ hệ gen của chủng *Mannheimia* sp. và là chủng mẹ của vi sinh vật đột biến *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) theo sáng chế, trong đó gen mã hóa fructoza phosphotransferaza (*fruA*) không bị làm mất.

Trong vi sinh vật đột biến sản sinh axit succinic *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) theo sáng chế, việc sản sinh sản phẩm phụ, bao gồm axit lactic, axit pyruvic, axit axetic và axit formic, được giảm thiểu đến mức thấp nhất và hiệu suất sản xuất axit succinic tăng gần tới hiệu suất theo lý thuyết (1,71-1,86mol/mol), khi so với chủng đột biến sản sinh axit succinic thông thường *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), điều này cho thấy rằng đây là chủng tuyệt vời để sản xuất axit succinic.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra vi sinh vật đột biến có khả năng sử dụng sucroza và glyxerin để sản xuất axit succinic, phương pháp này bao gồm việc làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza ở vi sinh vật sản sinh axit succinic.

Trong một ví dụ khác theo sáng chế, chủng *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP) có khả năng chuyển hóa đồng thời sucroza và glyxerin được thiết kế bằng cách đưa gen mã hóa glyxerin kinaza của *E. coli* vào ADN hệ gen của chủng

Mannheimia succiniciproducens PALK (KCTC10973BP). Chúng được thiết kế này sản sinh axit suxinic với năng suất và hiệu suất cao mà không có sản phẩm phụ.

Chúng vi sinh vật sản sinh axit suxinic *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP) cũng được so sánh theo cách được mô tả trên đây.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế còn đề xuất phương pháp sản xuất axit suxinic, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic như đã nêu trên đây ở các điều kiện kỵ khí; và thu hồi axit suxinic từ dịch nuôi cấy.

Theo sáng chế, việc nuôi cấy này có thể được tiến hành trong môi trường chứa cả hai nguồn cacbon là sucroza và glyxerin, và lượng các axit hữu cơ khác được sản xuất ra dưới dạng các sản phẩm phụ có thể là 1% theo khối lượng hoặc ít hơn tính trên lượng axit suxinic sản xuất được.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế còn đề cập đến phương pháp sản xuất axit suxinic với năng suất tăng, phương pháp này bao gồm các bước: (a) nuôi cấy ở các điều kiện kỵ khí hoặc vi sinh vật đột biến mà sản sinh axit suxinic với hiệu suất cao trong khi sản sinh ít hoặc không sản sinh các sản phẩm phụ hoặc vi sinh vật đột biến thu được bằng cách làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza do vậy mà vi sinh vật này có khả năng sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin; (b) cô đặc các tế bào vi sinh vật trong dịch nuôi cấy đến nồng độ cao; (c) nuôi cấy các tế bào ở nồng độ cao; và (d) thu hồi axit suxinic từ dịch nuôi cấy này.

Theo sáng chế, bước (b) cô đặc các tế bào trong dịch nuôi cấy đến nồng độ cao có thể được tiến hành bằng phương pháp nuôi cấy trong đó chủng sản xuất này được bổ sung vào môi trường nuôi cấy với nồng độ cao hoặc phương pháp dùng bình phản ứng sinh học tái tuần hoàn tế bào bằng màng ngăn (membrane cell recycling bioreactor - MCRB) (sau đây được gọi là “phương pháp MCRB”).

Theo phương pháp sản xuất axit suxinic sử dụng vi sinh vật đột biến theo sáng chế mà có thể sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin để sản xuất axit suxinic, axit suxinic có thể được sản xuất mà không có sản phẩm phụ với hiệu suất cực cao đạt gần tới hiệu suất theo lý thuyết. Ngoài ra, sucroza có giá thành bằng khoảng 1/4 giá thành của glucoza mà thường được sử dụng để sản xuất axit suxinic bằng phương pháp lên men nhờ vi khuẩn. Ngoài ra, với việc gia tăng nhanh trong sản xuất diezen sinh học trên toàn cầu, glyxerin

được sinh ra dưới dạng sản phẩm phụ, và do đó giá của chúng giảm do có nguồn cung dồi dào và phương pháp thích hợp để xử lý glyxerin là cần thiết. Do đó, giá thành của glyxerin là rất thấp và tiếp tục giảm (Miller-Klein Associates, Oct. 2006). Phương pháp sản xuất axit suxinic theo sáng chế có giá trị lớn, ở chỗ phương pháp này có thể sản xuất axit suxinic mang lại lợi nhuận cao bằng phương pháp lên men nhờ vi khuẩn, không phải phương pháp tổng hợp hóa chất đòi hỏi chi phí cho nguồn nguyên liệu thô lớn, sản xuất axit suxinic với hiệu suất cực cao đạt gần tới hiệu suất theo lý thuyết, và sản xuất axit suxinic với độ tinh khiết cực cao, do vậy mà có thể giảm thiểu các chi phí để tách và tinh chế sản phẩm.

Việc sử dụng chủng PALFK theo sáng chế cho phép sản xuất axit suxinic đồng nhất mà không có sản phẩm phụ với hiệu suất rất cao đạt gần tới hiệu suất theo lý thuyết (1,71 đến 1,86mol/mol). Ba yếu tố, bao gồm năng suất, hiệu suất, và tỷ lệ sản phẩm phụ/axit suxinic, là yếu tố quan trọng nhất trong sự công nghiệp hóa quá trình sản xuất axit suxinic. Cụ thể là, năng suất đi kèm với chi phí vốn ban đầu và chi phí năng lượng, và hiệu suất là thước đo về việc sử dụng hiệu quả nguyên liệu thô và đi kèm với chi phí nguyên liệu thô, chi phí này chiếm một phần đáng kể trong chi phí của quá trình sinh học, và tỷ lệ các sản phẩm phụ/axit suxinic đi kèm với chi phí để tách và tinh chế sản phẩm, chi phí này chiếm một nửa hoặc nhiều hơn tổng chi phí của quá trình sinh học.

Do đó, trong một ví dụ của sáng chế sử dụng chủng PALFK, hiệu suất được tối đa hóa và tỷ lệ các sản phẩm phụ/axit suxinic được giảm thiểu đến mức thấp nhất, do đó hai trong ba yếu tố chủ đạo nêu trên đây (hiệu suất và tỷ lệ các sản phẩm phụ/axit suxinic) được cải thiện đến các mức độ cao nhất có thể đạt được. Ngoài ra, đã có nhiều nỗ lực để tìm ra phương pháp cải thiện năng suất, và kết quả là, đã phát hiện ra rằng phương pháp nuôi cấy và phương pháp MCRB làm tăng nồng độ tế bào trong dịch nuôi cấy và cải thiện năng suất sản xuất axit suxinic ít nhất 2 lần và 10 lần, tương ứng, so với chủng gốc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây, sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn với sự viện dẫn đến các ví dụ. Hiển nhiên đối với các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật này là các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế và không làm giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế.

Cụ thể là, các ví dụ dưới đây chỉ minh họa một vector cụ thể và *Mannheimia* sp. là vi sinh vật sản sinh axit suxinic được dùng làm tế bào chủ để làm mất các gen theo sáng

chế. Tuy nhiên, sẽ là hiển nhiên đối với chuyên gia trong lĩnh vực này là việc sử dụng các loài vi sinh vật sản sinh axit succinic khác nhau cũng có thể tạo ra các vi sinh vật đột biến sản sinh axit succinic có độ tinh khiết cao.

Ví dụ 1: Thiết kế vector bị mất gen *fruA* (pSacHR06*fruA*)

Để làm mất gen *fruA* (gen mã hóa fructoza phosphotransferaza) từ hệ gen của vi sinh vật sản sinh axit succinic bằng phương pháp tái tổ hợp tương đồng, thiết kế một vector trao đổi gen theo phương pháp dưới đây. Đầu tiên, tiến hành PCR sử dụng ADN hệ gen của *M. succiniciproducens* MBEL55E (KCTC0769BP) làm khuôn và từng cặp mồi có trình tự là: cặp mồi SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 2, cặp mồi SEQ ID NO: 3 và SEQ ID NO: 4 và cặp mồi SEQ ID NO: 5 và SEQ ID NO: 6, do đó thu được các đoạn PCR tương ứng chứa vùng tương đồng phía trái của *fruA* (HL), gen kháng chloramphenicol (Cm) và vùng tương đồng phía phải của *fruA* (HR).

Sau đó, tiến hành PCR chồng lớp nhờ sử dụng ba đoạn PCR trên đây làm khuôn và các mồi có trình tự là SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 6, và đoạn ADN thu được được phân cắt bằng enzym giới hạn *SacI* và *PstI* và được đưa vào vector pSacHR06, do đó tạo ra vector pSacHR06*fruA*.

SEQ ID NO: 1: 5'-ATCGCGGATCCGGTGGAAACCCTCGGTTTATT

SEQ ID NO: 2: 5'-AATCTGCTCTGATGCGCAGCTAAAACCTGGTGCAATA

SEQ ID NO: 3: 5'-CCAGGTTTTAGCTGCGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAG

SEQ ID NO: 4: 5'-AATTACACTTGAAACCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTAC

SEQ ID NO: 5: 5'-ATCCACAGAATCAGGGTTTCAAGTGTAATTGGCGGAG

SEQ ID NO: 6: 5'-TCGACGCGTCGACTTCATCTAACCCCAACGCTTG

Ví dụ 2: Thiết kế chủng *M. succiniciproducens* PALFK

Chủng đột biến được thiết kế bằng cách làm mất gen *fruA* từ hệ gen của chủng *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) bằng cách sử dụng vector pSacHR06*fruA* được tạo ra trong Ví dụ 1 để làm mất gen *fruA*.

Cụ thể, cấy trái chủng *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) trên môi trường rắn BHI (Brain-Heart Infusion) và nuôi cấy ở nhiệt độ 39°C trong 36 giờ. Khuẩn lạc tạo thành được đưa vào trong 10mL môi trường BHI lỏng và nuôi cấy trong 12 giờ.

Dịch nuôi cấy tế bào sinh trưởng đủ được đưa vào 100mL môi trường BHI lỏng ở nồng độ 1% và nuôi cấy trong tủ nuôi cấy tĩnh ở nhiệt độ 39 °C.

Khi dịch nuôi cấy đạt OD₆₀₀ bằng 0,3-0,5 sau khoảng 4-5 giờ, giữ dịch nuôi cấy ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0 đến 4 °C trong 20 phút sao cho tế bào không sinh trưởng thêm nữa. Sau đó, ly tâm dịch nuôi cấy ở 4 °C ở tốc độ 4.500 vòng/phút trong 15 phút để thu tế bào. Sau đó, tạo huyền phù lại cho tế bào trong 200mL dung dịch glycerin 10% ở 4 °C và ly tâm ở các điều kiện được mô tả trên đây. Lặp lại bước tạo huyền phù và ly tâm tổng cộng ba lần trong khi giảm thể tích dung dịch glycerin 10% đi một nửa cho mỗi lần. Tạo huyền phù lại cho các tế bào thu được trong cùng thể tích dung dịch glycerin 10%, phân tán đều tế bào trong dung dịch glycerin và bảo quản ở nhiệt độ -80 °C.

Trộn huyền phù tế bào đậm đặc thu được như mô tả trên đây với vectơ mất gen pSacHR06*fruA* được tạo ra trong Ví dụ 1 và được đưa vào xung điện ở điều kiện 2,5kV, 25µF và 200Ω để biến nạp vectơ này vào chủng *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP). Bổ sung tế bào được xung điện vào môi trường BHI lỏng và nuôi cấy trong tủ nuôi cấy tĩnh ở 39 °C trong 1 giờ. Sau đó, cấy trải dịch nuôi cấy trên môi trường BHI rắn chứa 6,8µg/mL chất kháng sinh cloramphenicol và ủ trong tủ nuôi cấy tĩnh ở 39 °C trong 48 giờ hoặc lâu hơn. Để chọn khuẩn lạc trong đó có xảy ra sự trao đổi chéo kép, cấy trải các khuẩn lạc tạo thành trên môi trường BHI rắn chứa cloramphenicol (6,8µg/mL) và 100g/L sucroza và nuôi cấy trong 24 giờ, sau đó cấy trải lần nữa các khuẩn lạc tạo thành trên cùng môi trường.

Chủng đột biến thu được trên môi trường BHI rắn được nuôi cấy trong môi trường BHI lỏng chứa chất kháng sinh, và tách ADN hệ gen từ chủng được nuôi cấy bằng phương pháp của Rochelle và các đồng tác giả (Rochelle *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 100:59, 1992). Tiến hành PCR sử dụng ADN hệ gen tách được từ chủng đột biến làm khuôn, và điện di sản phẩm PCR để xác nhận liệu gen *fruA* đã bị loại bỏ khỏi ADN hệ gen chưa. Xác nhận việc liệu gen *fruA* đã bị loại bỏ hay chưa bằng cách tiến hành PCR hai lần theo cách sau đây. Đầu tiên, tiến hành PCR sử dụng ADN hệ gen của chủng đột biến làm khuôn và từng cặp mồi có trình tự là: cặp mồi SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO: 8 và cặp mồi SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10. Các đoạn PCR thu được từ hai phản ứng PCR trên được điện di để xác nhận việc loại bỏ gen *fruA* thông qua kích thước của các đoạn này. Kết quả là, chủng *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) được thiết

kế và được nộp lưu với số nộp lưu là KCTC11694BP tại Trung tâm sưu tập giống nuôi cấy Hàn Quốc (Korean Collection for Type Cultures - KCTC), Viện nghiên cứu sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc (Korean Research Institute of Bioscience and Biotechnology).

SEQ ID NO: 7: 5'-CTATGATTTGGTCGGGCGTTT

SEQ ID NO: 8: 5'-TGAATGGCAGAAATTCGAAA

SEQ ID NO: 9: 5'-TGATCTTCCGTCACAGGTAT

SEQ ID NO: 10: 5'-TTGACCGCACTTTGCACATC

Ví dụ 3: Thiết kế vector pME18glpK22 và thiết kế chủng *M. succiniciproducens* PALKG nhận vector này

Để thu được ADN chứa gen mã hóa glyxerin kinaza của *E. coli* (*glpK22*), tiến hành PCR sử dụng ADN hệ gen của *Escherichia coli* K-12 MG1655 (ATCC 47076; American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) và từng cặp mồi có trình tự là: cặp mồi SEQ ID NO: 11 và SEQ ID NO: 12, cặp mồi SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14 và cặp mồi SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 16. Sau đó, tiến hành PCR sử dụng sản phẩm thu được từ ba phản ứng PCR trên làm khuôn. Sản phẩm PCR chứa gen *glpK22*, trong đó cặp bazơ thứ 913 của trình tự mã hóa có adenosin được biến đổi từ guanin của gen *glpK* của chủng *E. coli* K-12 MG1655 gốc. Đã biết rằng glyxerin kinaza được biểu hiện từ gen *glpK* trải qua ít ức chế dị lập thể do FBP và IIA hơn so với *glpK* không đột biến. (Pettigrew *et al.*, J. Bacteriol., 178:2846, 1996).

SEQ ID NO: 11: 5'-ACTCCGGAATTCAACGCACTGACAATCTCACTT

SEQ ID NO: 12: 5'-CAGCGAAGCTTTTTGGGTAGAAAGTATAAAGACAGAATCACA

SEQ ID NO: 13: 5'-TTTATACTTTCTACCCAAAAAGCTTCGCTGTAATATG

SEQ ID NO: 14: 5'-CCATAAACACCGCACTTTCCAACGCATAGTTCACTTC

SEQ ID NO: 15: 5'-AACTATGCGTTGGAAAGTGCGGTGTTTATGGCAGG

SEQ ID NO: 16: 5'-ACCTGCGAGCTCATTATTGATGTGTGCGGGGT

Tách dòng sản phẩm PCR thu được như mô tả trên đây vào trong các vị trí EcoRI và SacI của pME18 (Jang *et al.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73:5411, 2007), do đó tạo ra vector pME18glpK22. Ngoài ra, vector này còn được giải trình tự nhờ sử dụng các mồi có trình tự SEQ ID NO: 17 đến SEQ ID NO: 21, là sản phẩm của Solgent (Hàn Quốc).

SEQ ID NO: 17: 5'-TAGCTATGTGTTAAAGCCTT

SEQ ID NO: 18: 5'-ACCAGGGCACCACCAGCTCC

SEQ ID NO: 19: 5'-CCGATTACACCAACGCCTCT

SEQ ID NO: 20: 5'-ATGTGGTTCCGGCATTACC

SEQ ID NO: 21: 5'-TTATGCCGCATCCGGTAGTCCC

Đưa vector pME18glpK22 được thiết kế như mô tả trên đây vào chủng *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) để tạo ra chủng *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP). Để đưa vector biểu hiện vào, chuẩn bị và xung điện cho huyền phù tế bào đậm đặc như được mô tả trong Ví dụ 2, và cấy trái tế bào trên môi trường BHI rắn chứa 25µg/mL ampicilin thay vì cloramphenicol và nuôi cấy trong tủ nuôi cấy tĩnh ở 39°C trong 48 giờ. Khuẩn lạc tinh khiết tạo thành được nuôi cấy trong môi trường BHI lỏng trong 8 giờ, và sau đó trộn với dung dịch glycerin đến nồng độ cuối là 15% (khối lượng/thể tích), sau đó bảo quản dung dịch tế bào ở nhiệt độ -80°C cho đến khi sử dụng.

Ví dụ 4: Sản xuất axit succinic đồng nhất bằng cách sử dụng chủng *M. succiniciproducens* PALFK và chủng PALFK

Nuôi cấy chủng *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) hoặc PALKG (KCTC11693BP) được tạo ra trong các Ví dụ 2 và 3 trong 10mL môi trường MH5 (thành phần trong một lít môi trường MH5 gồm: 2,5g cao men, 2,5g polypepton, 1g NaCl, 0,02g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8,7g K_2HPO_4 , và 10,0g NaHCO_3) chứa 10g/L sucroza và nuôi cấy ở điều kiện kị khí ở nhiệt độ 39°C trong 8 giờ. Sau đó, chủng này được nuôi cấy trong 300mL môi trường tương tự. Để lên men, ủ dịch nuôi cấy trong bình phản ứng vi khuẩn (Bioflo 3000, New Brunswick Scientific Co., Edison, NJ, USA) chứa 2,5L môi trường tổng hợp (thành phần trong một lít môi trường tổng hợp gồm: 1g NaCl, 2g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0,02g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,2g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 8,709g K_2HPO_4 , 0,5g xystein, 0,5g metionin, 0,5g alanin, 0,5g asparagin, 0,5g axit aspartic, 2,46g prolin, 0,5g serin, 0,005g axit nicotinic, 0,005g Ca-pantothenat, 0,005g pyridoxin.HCl, 0,005g thiamin, 0,005g axit ascorbic và 0,005g biotin). Tiến hành lên men ở các điều kiện nồng độ sucroza ban đầu là 22,25g/L (65mM), nồng độ glycerin ban đầu là 4,6g/L (50mM), nhiệt độ là 39°C và 200 vòng/phút đồng thời nạp khí cacbon dioxid tinh khiết vào trong bình phản ứng với tốc độ 0,2 vvm (thể tích cacbon dioxid/thể tích làm việc của tủ nuôi cấy/phút). Trong suốt quá trình lên men, dịch nuôi cấy được điều chỉnh đến độ pH bằng 6,5 bằng dung dịch

amoniac, và bổ sung các chất kháng sinh sau đây: 50 μ g/mL spectinomycin đối với chủng PALK, 6,8 μ g/mL cloramphenicol đối với PALFK, và 25 μ g/mL ampicillin đối với PALKG. Để sản xuất axit succinic nồng độ cao, khi các nguồn cacbon được tiêu thụ hoàn toàn, bổ sung bán liên tục 700g/L sucroza và dung dịch glycerin vào dịch nuôi cấy. Để so sánh hiệu suất của chủng PALFK, chủng *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) là chủng sản xuất axit succinic được nuôi cấy theo phương pháp tương tự như được mô tả trên đây. Nồng độ tế bào trong dịch nuôi cấy được đo bằng quang phổ kế và được tính toán bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ đo được trên đây của quang phổ kế và thử nghiệm kiểm tra đối với khối lượng tế bào khô. Trong quá trình lên men, định kỳ lấy mẫu từ bình phản ứng sinh học. Ly tâm các mẫu thu được ở tốc độ 13.000 vòng/phút trong 10 phút, và sau đó phân tích nồng độ của các chất chuyển hóa khác nhau, axit succinic, sucroza và glycerin trong dịch nổi bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (high-performance liquid chromatography - HPLC).

Kết quả như được thể hiện trên Fig.2 và Bảng 1, chủng *M. succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP) thể hiện hiệu suất axit succinic sản xuất được cao hơn so với chủng *M. succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP) và sản xuất được axit succinic có độ tinh khiết cao mà không tạo ra sản phẩm phụ. Lượng tiêu thụ glycerin thể hiện cùng mức độ giảm khi lượng axit succinic tăng khoảng 7 lần, và sự tiêu thụ glycerin này liên quan trực tiếp với việc sản sinh lượng sản phẩm phụ giảm, bởi vì sản xuất pyruvat, mà liên quan trực tiếp với việc sản sinh sản phẩm phụ không làm trung gian, không giống như khi sucroza được sử dụng. Ngoài ra, việc tăng tiêu thụ glycerin làm giảm lượng sucroza được sử dụng, do vậy mà axit succinic đồng nhất được sản xuất với hiệu suất cao và các nguồn cacbon được sử dụng với lượng giảm.

Ngoài ra, chủng *M. succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP) thể hiện hơi khác một chút so với chủng PALFK, trong đó việc sử dụng glycerin trong chủng PALKG tăng trong khoảng mà không ảnh hưởng đến việc sử dụng sucroza và sinh trưởng tế bào, và do đó việc tích tụ pyruvat được duy trì ở mức độ tương đương với mức độ tích tụ pyruvat trong chủng PALK. Tuy nhiên, khả năng sử dụng glycerin của chủng PALKG cao hơn ít nhất hai lần so với chủng PALK, và kết quả là, chủng PALKG sản xuất được axit succinic với hiệu suất là 1,39mol/mol, là cao hơn so với chủng PALK (1,24mol/mol).

Bảng 1: Các chỉ số của quá trình nuôi cấy chủng *Mannheimias*

Chủng	PALK	PALFK	PALKG
Sucroza (g/L)	77,88	39,80	61,87
Glyxerin (g/L)	5,52	29,75	11,84
Axit suxinic (g/L)	65,05	68,41	64,67
Axit pyruvic (g/L)	8,00	0	7,70
Axit axetic (g/L)	1,43	1,03	0,62
Tổng sản phẩm phụ (g/L)	9,44	1,03	8,32
Sản phẩm phụ/axit suxinic	0,15	0,02	0,13
Hiệu suất (mol/mol)	1,24	1,57	1,39

* Các giá trị đối với sucroza và glyxerin là các giá trị được biểu hiện dưới dạng lượng tiêu thụ, và các giá trị đối với axit suxinic, axit pyruvic và axit axetic là lượng các axit được sản xuất. Hiệu suất là giá trị thu được bằng cách tính toán các hàm lượng sucroza và glyxerin dựa trên đương lượng glucoza.

** Từng giá trị trong số các giá trị đối với sucroza và glyxerin, lượng và hiệu suất được sản xuất ra là giá trị trung bình của ba thử nghiệm độc lập.

Ví dụ 5: Cải thiện năng suất sản xuất axit suxinic của chủng *M. succiniciproducens* PALFK là chủng sản xuất axit suxinic đồng nhất với hiệu suất cao

Trong Ví dụ này, tiến hành thử nghiệm phương pháp cải thiện năng suất sản xuất axit suxinic của chủng *M. succiniciproducens* PALFK, là chủng sản xuất axit suxinic đồng nhất với hiệu suất cao.

Như có thể thấy trên Fig.2B, chủng PALFK đạt năng suất cao nhất ở thời điểm khoảng từ 13 đến 15 giờ sau khi nuôi cấy, và nồng độ tế bào là cao nhất ở thời điểm đó. Do đó, để tối đa năng suất sản xuất axit suxinic, tiến hành thử nghiệm về sự thay đổi năng suất sản xuất axit suxinic do sự tăng nồng độ tế bào.

Để kiểm tra sự thay đổi về năng suất sản xuất axit suxinic khi nồng độ tế bào ban đầu của chủng PALFK ở các điều kiện nuôi cấy như được mô tả trong Ví dụ 4 tăng đến $OD_{600} = 9,03$, tiến hành thử nghiệm sau. Như được mô tả trong Ví dụ 4, tiến hành lên men trong bình phản ứng vi khuẩn (Bioflo 3000) chứa 5L môi trường MH5 chứa

22,25g/L sucroza và 10g/L glyxerin ở các điều kiện nhiệt độ là 39 °C và 200 vòng/phút trong khi nạp khí cacbon dioxit tinh khiết vào trong môi trường ở tốc độ 0,2 vvm (thể tích carbon dioxit/thể tích làm việc tử nuôi cấy/phút). Trong quá trình lên men, dịch nuôi cấy được điều chỉnh đến độ pH bằng 6,5 bằng cách bổ sung dung dịch amoniac, và bổ sung 6,8µg/mL chất kháng sinh cloramphenicol vào môi trường. Nồng độ tế bào của chủng PALFK đạt OD₆₀₀ bằng khoảng 4,6, dừng quá trình nuôi cấy, và ly tâm dịch nuôi cấy ở nhiệt độ trong phòng ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 10 phút để thu cặn vón tế bào. Phần cặn vón tế bào thu được được tạo huyền phù lại trong 300mL môi trường MH5 để thu được nồng độ dung dịch giống cấy cao, sau đó giống cấy này được cấy và nuôi cấy trong môi trường tổng hợp ở các điều kiện được mô tả trong Ví dụ 4. Kết quả là, như có thể thấy trên Fig.3 và Bảng 2, năng suất sản xuất axit suxinic là 6,03g/lít/giờ (năng suất cao nhất: 10,69g/lít/giờ), là cao hơn ít nhất hai lần so với trong các điều kiện ban đầu, và mức độ sản xuất sản phẩm phụ và hiệu suất axit suxinic hầu như là không thay đổi so với các giá trị đó ở các điều kiện ban đầu.

Dựa trên các kết quả này, để làm tăng theo nhân tạo nồng độ tế bào, sử dụng hệ bình phản ứng sinh học tái tuần hoàn tế bào bằng màng ngăn (MCRB) (Fig.4A).

Trong hệ thống MCRB, bộ phận màng bằng sợi rỗng (CellFlo Plus Module; Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA, USA) để tái tuần hoàn tế bào được nối vào bình phản ứng Bioflo 110 (New Brunswick Scientific Co.), và thể tích làm việc của bình phản ứng sinh học được duy trì ở 0,4L. Tốc độ khuấy trong bình phản ứng sinh học được duy trì ở 100 vòng/phút, và bơm màng ngăn để tái tuần hoàn tế bào được vận hành ở tốc độ 150mL/phút.

Thành phần của môi trường tổng hợp là giống như được sử dụng trong Ví dụ 4, ngoại trừ việc có chứa 0,5g/L prolin. Trong bình phản ứng sinh học, nồng độ sucroza ban đầu là 22,25g/L, và nồng độ glyxerin ban đầu là 4,6g/L, và trong bể nạp liệu, sử dụng 30g/L sucroza và 21g/L glyxerin. Trong quá trình vận hành MCRB, tốc độ pha loãng (D) được duy trì ở 1,027 giờ⁻¹, và tốc độ tháo tế bào ra mà xác định sự sinh trưởng tế bào ở trạng thái bình thường được duy trì ở 0,015 giờ⁻¹. Trong quá trình vận hành MCRB, phân tích mẫu ít nhất 5 lần ở các khoảng cách thời gian dài hơn so với thời gian luân chuyển tối thiểu (chỉ thời gian đạt tới thể tích làm việc là hàm của tốc độ pha loãng (D) trong quá trình nuôi cấy; ở D=1 hoặc 2, thời gian đạt tới thể tích làm việc là 1 giờ và 0,2 giờ) để xác

định nồng độ tế bào, sản xuất các chất chuyển hóa, tiêu thụ các nguồn cacbon, và tương tự, và trạng thái trong đó các phép đo này được duy trì ở các mức độ không đổi được xác định như trạng thái thông thường.

Các kết quả nuôi cấy được tiến hành trong MCRB như được mô tả trên đây được thể hiện trên Fig.4B và Bảng 2. Như có thể thấy ở đây, năng suất sản xuất axit succinic của chủng PALFK là 29,73g/lít/giờ, cao hơn ít nhất 10 lần so với chủng gốc. Ngoài ra, hiệu suất axit succinic được duy trì ở mức độ tương tự, và việc sản sinh sản phẩm phụ cao hơn một chút so với trong Ví dụ 4, nhưng được duy trì ở mức độ thấp. Kết luận là, như được thể hiện trong Ví dụ này, các tác giả sáng chế đã thành công trong việc sản xuất axit succinic với năng suất cực cao là 29,73g/lít/giờ với hiệu suất cao (1,54mol/mol) gần đạt tới hiệu suất theo lý thuyết, bằng cách sử dụng chiến lược làm tăng năng suất sau khi tối đa hóa hiệu suất và giảm sản xuất sản phẩm phụ. Năng suất sản xuất axit succinic được thể hiện trong Ví dụ này là năng suất cực cao mà chưa có phương pháp thông thường bất kỳ nào đạt được, và có ý nghĩa lớn là thu được sản phẩm với hiệu suất gần đạt tới hiệu suất theo lý thuyết là 1,54mol/mol.

Bảng 2: Các chỉ số của quá trình nuôi cấy chủng PALFK bằng các phương pháp lên men khác nhau

Dạng lên men	Lên men bổ sung cơ chất	Lên men bổ sung cơ chất'	MCRB
Sucroza (g/L)	39,80	53,08	19,71
Glyxerin (g/L)	29,75	26,89	8,11
Axit succinic (g/L)	68,41	78,41	29,00
Axit pyruvic (g/L)	0	1,64	3,86
Axit axetic (g/L)	1,03	0,72	0,81
Tổng sản phẩm phụ (g/L)	1,03	2,36	4,27
Sản phẩm phụ/axit succinic	0,02	0,03	0,15
Hiệu suất (mol/mol)	1,57	1,64	1,54
Năng suất tối đa (g/L/giờ)	2,46	6,03	29,73
Năng suất tổng thể (g/L/giờ)	4,55	10,69	29,73

* Lên men bổ sung cơ chất' là lên men bổ sung được cấy bổ sung nồng độ tế bào cao ($OD_{600} = 9,03$ ngay sau khi cấy ban đầu) trong quá trình lên men bổ sung cơ chất.

** Dữ liệu đối với lên men bổ sung cơ chất là giá trị trung bình của ba thử nghiệm độc lập, và dữ liệu đối với MCRB là giá trị trung bình của 5 mẫu thu được liên tiếp sau khi đạt được trạng thái bình thường.

[Nộp lưu các vi sinh vật]

Viện nộp lưu: Viện nghiên cứu sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc
(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology);

Số nộp lưu: KCTC 11693BP;

Ngày nộp lưu: 10 tháng 5 năm 2010.

Viện nộp lưu: Viện nghiên cứu sinh học và công nghệ sinh học Hàn Quốc;

Số nộp lưu: KCTC 11694BP;

Ngày nộp lưu: 10 tháng 5 năm 2010.

Khả năng áp dụng công nghiệp

Như được mô tả trên đây, khi nuôi cấy vi sinh vật đột biến sản sinh axit succinic, vi sinh vật này sử dụng đồng thời sucroza và glycerin, do đó axit succinic có thể được sản xuất với năng suất cao có hiệu suất tối đa đạt gần tới hiệu suất theo lý thuyết đồng thời giảm đến mức thấp nhất sự sản xuất các sản phẩm phụ. Ngoài ra, nhiều hóa chất khử khác nhau mà được sản xuất với lượng thấp bằng phương pháp thông thường có thể được sản xuất một cách hiệu quả hơn bằng phương pháp theo sáng chế.

Mặc dù sáng chế được mô tả chi tiết bằng cách viện dẫn đến các dấu hiệu cụ thể, các chuyên gia trong lĩnh vực này cần phải hiểu rằng phần mô tả này chỉ nhằm mô tả phương án được ưu tiên và không nhằm giới hạn phạm vi của sáng chế. Do đó, phạm vi của sáng chế sẽ được xác định bởi các điểm yêu cầu bảo hộ dưới đây và các dạng tương đương của chúng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

- 1 Vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic, vi sinh vật đột biến này đã đứt gãy gen mã hóa fructoza phosphotransferaza (*fruA*) hoặc có đưa vào gen mã hóa glyxerin kinaza có nguồn gốc từ *E. coli*, trong đó vi sinh vật sản sinh axit suxinic này được chọn từ nhóm gồm có *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., và *Anaerobiospirillum* sp..
2. Vi sinh vật đột biến theo điểm 1, trong đó vi sinh vật đột biến này là *Mannheimia succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP).
3. Vi sinh vật đột biến theo điểm 1, trong đó vi sinh vật đột biến này là *Mannheimia succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP).
4. Vi sinh vật đột biến theo điểm 1, trong đó vi sinh vật đột biến này sử dụng glyxerin và sucroza một cách đồng thời làm nguồn cacbon để sản xuất axit suxinic.
5. Vi sinh vật đột biến theo điểm 1, trong đó vi sinh vật đột biến này thu được bằng cách làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin qua trung gian sucroza ở vi sinh vật sản sinh axit suxinic.
6. Phương pháp tạo ra vi sinh vật đột biến có khả năng sử dụng sucroza và glyxerin để sản xuất axit suxinic, phương pháp này bao gồm bước làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa glyxerin ở vi sinh vật sản sinh axit suxinic, trong đó vi sinh vật sản sinh axit suxinic được chọn từ nhóm gồm có *Mannheimia succiniciproducens* PALK (KCTC10973BP), *Basfia* sp., *Actinobacillus* sp., và *Anaerobiospirillum* sp., và trong đó việc làm giảm cơ chế kìm hãm sản phẩm dị hóa được thực hiện bằng cách làm mất gen mã hóa fructoza phosphotransferaza (*fruA*) hoặc đưa vào gen mã hóa glyxerin kinaza có nguồn gốc từ *E.coli*.
7. Phương pháp theo điểm 6, trong đó vi sinh vật đột biến này là *Mannheimia succiniciproducens* PALKG (KCTC11693BP).
8. Phương pháp theo điểm 6, trong đó vi sinh vật đột biến này là *Mannheimia succiniciproducens* PALFK (KCTC11694BP).

9. Phương pháp sản xuất axit suxinic, phương pháp này bao gồm các bước: nuôi cấy vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic theo điểm 1 trong môi trường chứa cả sucroza và glyxerin nhờ đó tạo ra axit suxinic; và thu hồi axit suxinic sinh ra từ dịch nuôi cấy.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Viện Khoa học và Công nghệ tiên tiến Hàn Quốc

<120> Vi sinh vật đột biến sản sinh axit suxinic bằng cách sử dụng đồng thời sucroza và glyxerin, phương pháp tạo ra vi sinh vật đột biến này và phương pháp sản xuất axit suxinic nhờ sử dụng vi sinh vật này

<130> PF-B1186

<140> PCT/KR2011/006382

<141> 2011-08-30

<150> 10-2010-0084327

<151> 2010-08-30

<160> 21

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 32

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 1

atcgcgatc cgggtgaaac cctcggttta tt

32

<210> 2

<211> 37

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 2

aatctgctct gatgcgcagc taaaacctgg tgcaata 37

<210> 3

<211> 40

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 3

ccaggtttta gctgcgcac agagcagatt gtactgagag 40

<210> 4

<211> 41

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 4

aattacactt gaaacctga ttctgtggat aaccgtatta c 41

<210> 5

<211> 37

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 5

atccacagaa tcagggttc aagtgttaatt ggcggag 37

<210> 6

<211> 34

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 6

tcgacgcgtc gacttcattc aacccaacg ctg 34

<210> 7

<211> 21

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 7

ctatgatttg gtcgggcgtt t

21

<210> 8

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 8

tgaatggcag aaattcgaaa

20

<210> 9

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mới

<400> 9

tgatcttcg tcacaggtat

20

<210> 10

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 10

ttgaccgcac ttgacacac

20

<210> 11

<211> 33

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 11

actccggaat tcaacgcact gacaatctca ctt

33

<210> 12

<211> 42

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 12

cagcgaagct ttttgggtag aaagtataaa gacagaatca ca

42

<210> 13

<211> 37

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 13

tttatacttt ctacccaaaa agcttcgctg taatatg

37

<210> 14

<211> 37

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 14

ccataaacac cgcactttcc aacgcatagt tcacttc

37

<210> 15

<211> 35

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 15

aactatgcgt tggaaagtgc ggtgtttatg gcagg 35

<210> 16

<211> 32

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 16

acctgcgagc tcattattga tgtgtgcggg gt 32

<210> 17

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> mỗi

<400> 17

tagctatgtg ttaaagcctt 20

<210> 18

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 18

accagggcac caccagctcc 20

<210> 19

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 19

ccgattacac caacgcctct 20

<210> 20

<211> 20

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 20

atgtggtcc ggcattacc

20

<210> 21

<211> 22

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> môi

<400> 21

ttatgccgca tccggtagtc cc

22

FIG. 1

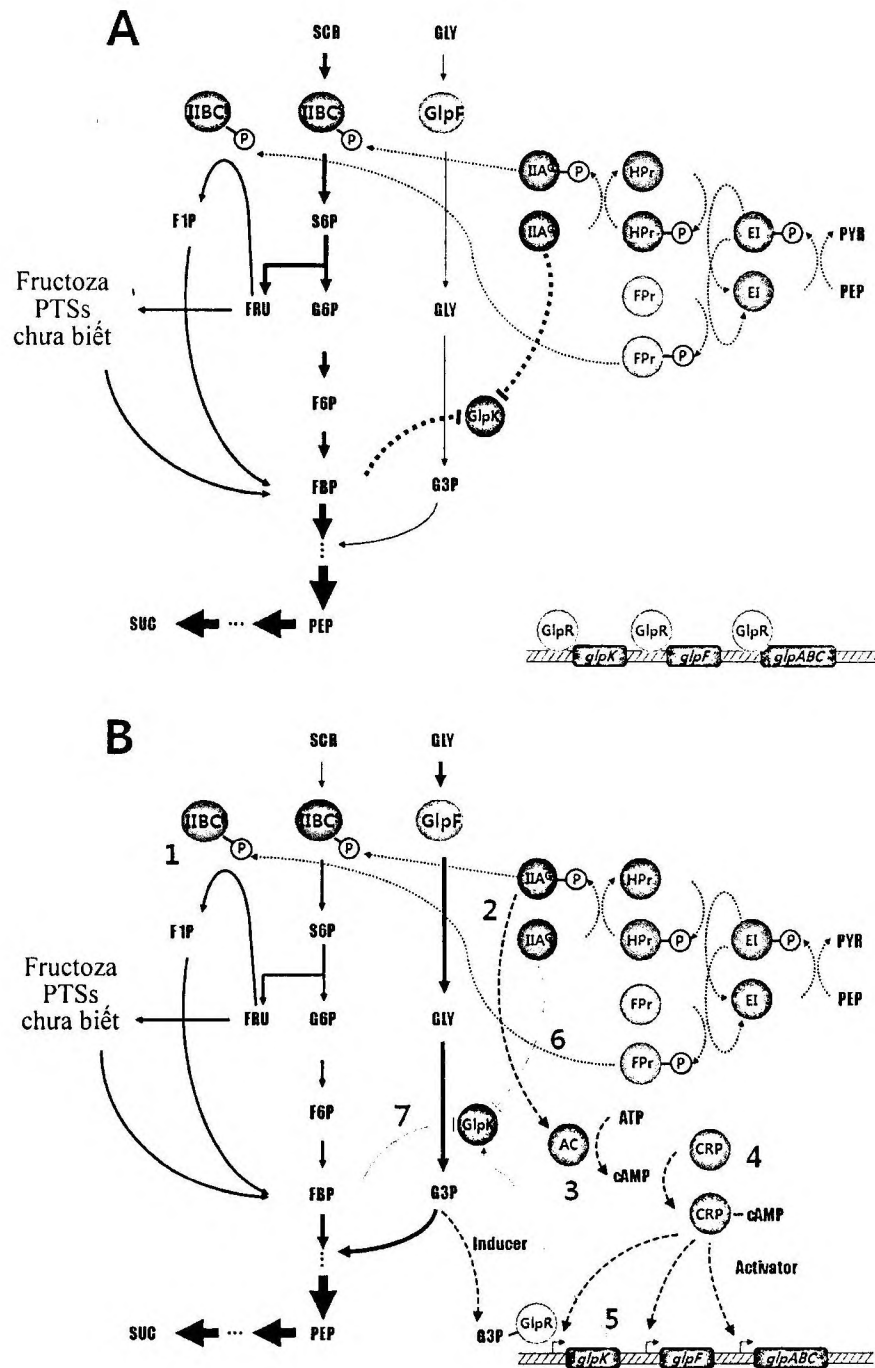


FIG. 2

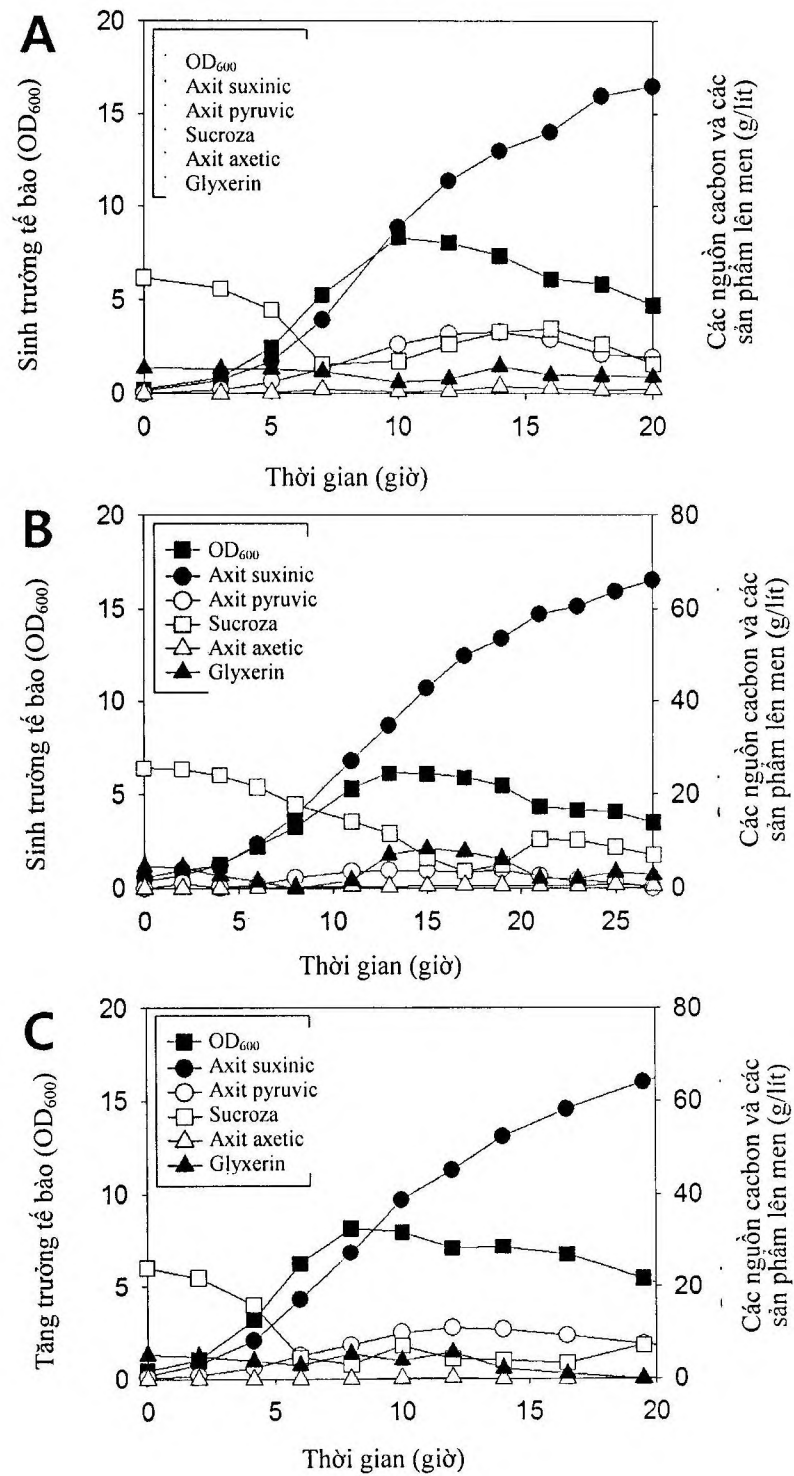
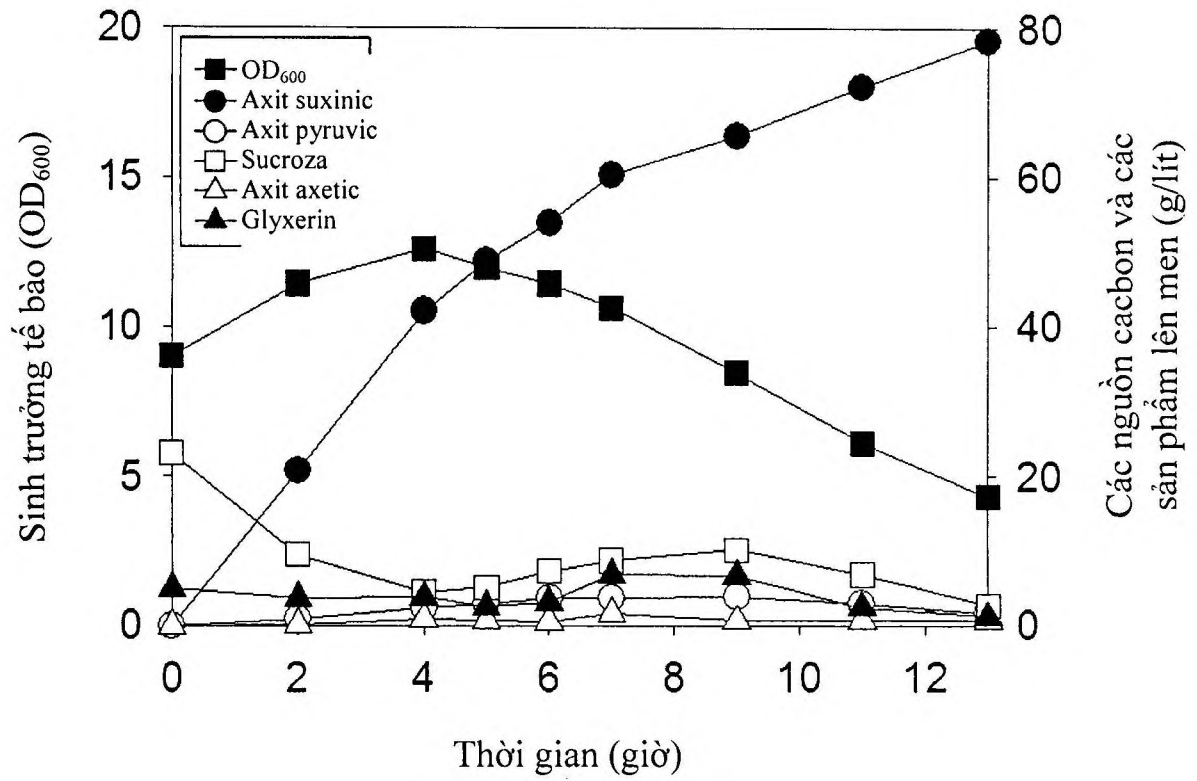
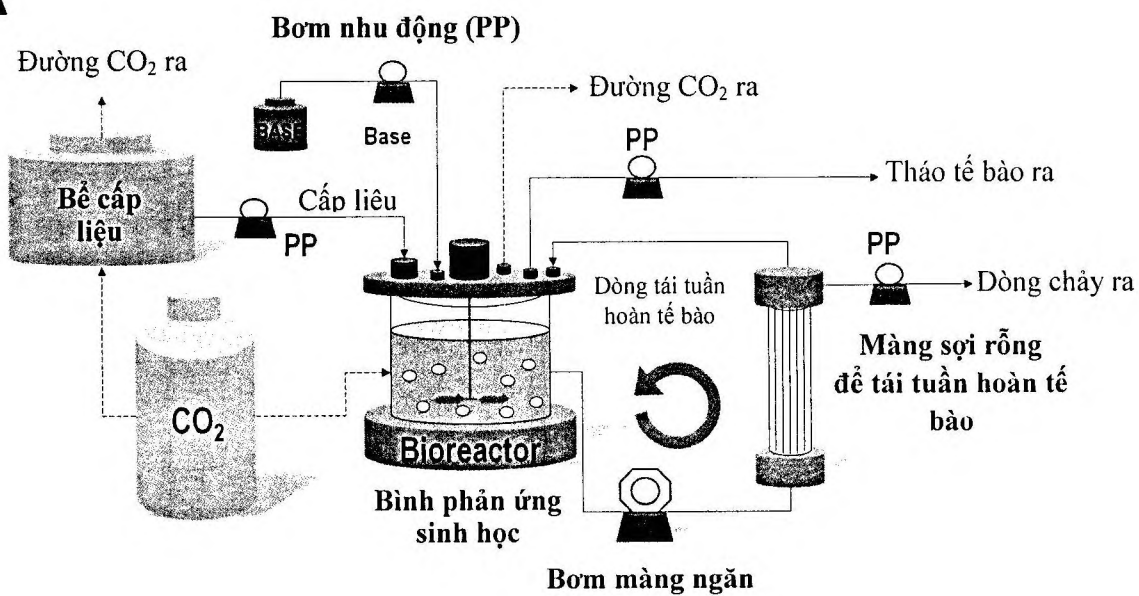
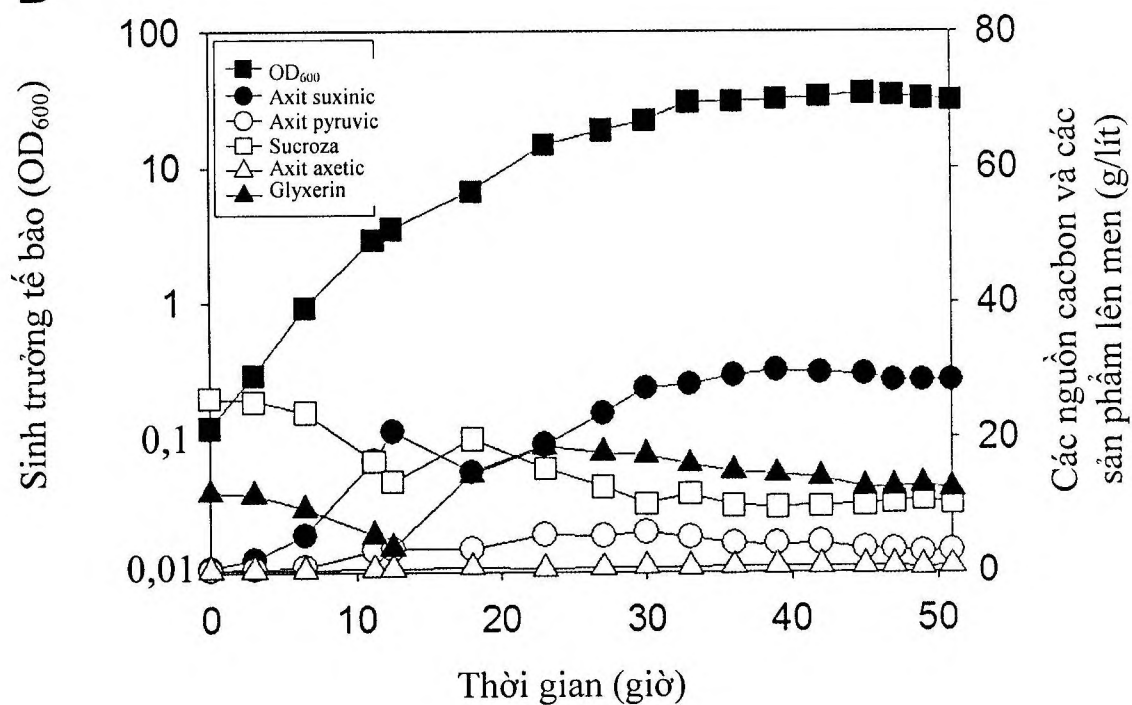


FIG. 3



A**B**

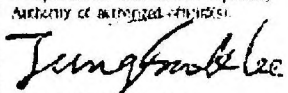
RECEIPT IN THE CASE OF THE INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
OF MICROORGANISMS FOR THE DEPOSIT OF CULTURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

(Issued pursuant to Rule 7.1)

TO: LEE Sang Yup
Dept. of Chemical and Biomolecular Eng., KAIST
335 Guseong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-701
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR <i>Manihottia succiniciproducens</i> PALKG	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY KCTC 116930P
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: (a) a scientific description (b) a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on May 10, 2010.	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____.	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBS) 111 Guseong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-800 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or authorized official(s)  Mr. Jung-Sook, Director Date: May 17, 2010

INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY OF THE DEPOSITARY
OF MICROORGANISMS AND OF PLANTS AND ANIMALS

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 7.1

TO: LEE, Sang-Yoo
Dept. of Chemical and Biomolecular Eng. KAIST
235 Guseong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-701
Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the DEPOSITOR	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
<i>Mannheimia succiniciproducens</i> PALFK	KCTC 11694BP

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:
☒ a scientific description
☐ a proposed taxonomic designation
 Mark with a cross where applicable

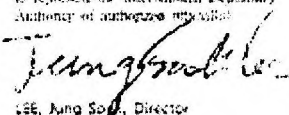
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on **May 10, 2010**.

IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by the International Depository Authority on _____ and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____.

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Korean Collection for Type Cultures	Signature of person(s) having the power to represent the International Depository Authority of authorize official
Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KIBB) 137 Guseong-ro, Yuseong-gu, Daejeon 305-380 Republic of Korea	 LEE, Sang-Yoo, Director Date: May 17, 2010